

L細胞で産生されたSendai ウイルスのL細胞に対する 吸着の特異性に就いて

著者	本間 守男
号	29
発行年	1961
URL	http://hdl.handle.net/10097/17662

氏 名 ほん ま もり お
本 間 守 男

授 与 学 位 医 学 博 士

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 3 6 年 3 月 8 日

学 位 授 与 の 根 拠 法 規 学 位 規 則 才 5 条 才 2 項

最 終 学 歴 昭 和 3 0 年 3 月 東 北 大 学 医 学 部 卒 業

学 位 論 文 題 目 L細胞で産生された Sendai ウイルスの L細胞
に対する吸着の特異性に就いて

論文審査委員 東北大学教授 石 田 名 香 雄

東北大学教授 赤 崎 兼 義

東北大学教授 荒 川 雅 男

論文 内 容 要 旨

緒 言

前報に於てSendai ウイルス (Myxovirus para-influenzae 1, HVJ) がL細胞内で増殖し、且つ特異的な細胞変性効果を示す事に就いて報告した。継代可能な組織培養細胞に於けるインフルエンザウイルスの増殖に関しては既に報告があるが、吾々の系は感染粒子を産生する点に於て、従来報告された系とは大いに異つて居る。しかも此のL細胞で産生されたウイルスは、卵に対する感染力を有するに拘らず、L細胞に対する感染力を消失し、且つ本来の溶血能をも失つて居る事が注目された。即ちL細胞産生Sendai ウイルスを再びL細胞に感染させても、S抗原や赤血球凝集素等の如何なるウイルス抗原も、感染性粒子もL細胞内に証明する事が出来ない。更に蛍光抗体法を用いて此の事実は裏付けされた。然し此のL細胞産生ウイルスを元の宿主である卵に接種すると、L細胞通過に依り一旦消失した二つの活性、即ちL細胞に対する感染性と溶血能が再び復活する。此の意味に於てL細胞産生ウイルスは宿主依存性の変異株と考えるのが妥当と思われる。

此の実験は此の変異株がL細胞に対する感染性を持たない理由を解明する事を企図して行われた。結論的に云えば、L細胞産生ウイルスはL細胞に対する吸着能は有るが、 36°C で再び遊出して来る。此れは丁度赤血球に対するMyxovirusの吸着の仕方と同じである。更に此のウイルスのL細胞に対する吸着は、抗ウイルス血清により容易に取除かれる。此れ等の事実から、此のウイルスはL細胞に対しては可逆的な結合しか造り得ず、不可逆的結合過程迄進み得ず、其の為にウイルス合成迄至らないものと考えられた。

実験材料及び方法

1. ウイルス

漿尿液ウイルス (E-Orig.) : HVJ 伏見株 ($M_1F_1M_3E_{20} \sim E_{35}$) を 10^{-6} に稀釈し、其の 0.2 ml を10日の発育鶏卵漿尿腔内に接種し、 36°C 48時間培養後の漿尿液を用いた。各継代に就いて50%卵感染価 (EID 50) 及び赤血球凝集価 (HA 価) を測定した。通常此のウイルス液のEID 50は $10^{0.6}/\text{ml}$, HA 価は $10^{3.6}/\text{ml}$ で従つてEID 50/HAは $10^{6.2}$ 前後である。

L細胞産生ウイルス (L-Var.) : L細胞の組織培養に上記E-Orig.をMaintenance solution (MS) で10倍に稀釈して接種し、 36°C で48時間培養後培養液を集め、低速遠心上清をL-Var.として用いた。此のウイルスのEID 50及びHA 価は夫々 $10^{6.6} \sim 10^{7.5}$, $10^{2.1} \sim 10^{2.7}$ で従つてEID 50/HAは $10^{4.5} \sim 10^{5.2}$ の間にある。

2. 超遠心に依るウイルスの精製

特に断らない限り原則として下記の如き精製ウイルスを実験に使用した。E-Orig.は48時間培養漿尿液に就いて、3000rpm 15分の低速遠心を行い、上清を更に40,000g 30分遠心してウイルスを落とし、沈渣をM/100, PH 7.1の磷酸緩衝食塩水 (PBS) に再浮遊したものを使用した。L-Var.に関しては、100,000g 30分の遠心によりウイルスを沈降せしめた以外、E-orig.と同様に処理した。

3. 卵感染価 (EID 50) の測定

被検材料の10倍稀釈系列を造り、其中5つの各稀釈に就いて4個の10日卵に、0.2 ml 宛漿鼠腔に接種して72時間36°Cに培養後、赤血球凝集素の有無を検し、Reed & Muenchの方法に従つて50%卵感染価(EID₅₀)を算出した。

4. 赤血球凝集価(HA価)の測定

被検材料を生理食塩水で0.5 mlの2倍稀釈系列を造り、0.5%のニワトリ赤血球を等量加え、4°C1時間後Salkのパターン法に依つて判定した。特に精密な力価が要求される場合には、Horsfall & Tammの方法に従つて行つた。

5. 組織培養法

トリプシン継代を重ねた当教室保存のL細胞を使用した。細胞の増殖用培地としては、10%の牛血清加YLE培地を使用し、ウイルス増殖用のMSとしては、5%非働化馬血清加YLE培地を使用した。方法の詳細に就いては既に前報に於て報告した。

6. 抗血清の造り方

HA価2048/mlのE-Origを5 ml宛4日間隔で家兎静脈内に接種し、最後の注射から1週間後に採血した。此の血清の赤血球凝集抑制価(HAI価)は5000/ml前後である。

7. 蔗糖密度勾配遠心法

PBSで60, 50, 40, 30及び20%の蔗糖溶液を造り、これをSpinco SW用沈降管に夫々濃度の高い順に、下から上に向つて0.5, 1, 1, 1及び0.5 cmの深さに蔗糖液を静かに重層し4°C1晩放置後、100,000 g 30分の遠心沈積せるL-Var. 及びE-Origのウイルス液を0.5 cm重層し、冷却し乍ら100,000 g 1時間遠心を行う。其の後上の方から任意の間隔で、ツベルグリン針を直接遠心管に穿刺して各分割を取り出し、夫々に就いてHA価及びEID₅₀を測定した。

実 験 成 績

1. L-Var.のL細胞に対する吸着

L-Var.は再びL細胞に対する感染力を持たないが、卵に対する感染性は猶保持して居る。しからば果してL-Var.はL細胞に対してや一段階の吸着が起るのだろうか。PBSで種々の濃度のL細胞浮遊液を造り、其の1 mlに種々の濃度のL-Var. 及びE-Orig. 液を1 ml宛加え4°Cに保つ。15分毎に軽く振盪し1時間後に低速遠心を行い、上清HA価をHorsfall & Tammの方法に従つて測定した。其の結果はL-Var.とE-Orig.との間には吸着量の相違なく、吸着量は細胞数に比例する。

2. 干渉現象に及ぼすL-Var.とE-Orig.の量的関係

L-Var.をL細胞に感染させた場合、感染を受けた細胞はE-Orig.の攻撃に耐える様になる即ちL-Var.はE-Orig.を干渉する。此の干渉因子はウイルス粒子自身にあり、ウイルスを含む材料の100,000 g 60分遠心上清には存在しない。此処では干渉に及ぼすL-Var.とE-Orig.の量的比の影響に就いて実験を行つた。其の結果は干渉の強さはL-Var./E-Orig.の比に比例する。此の関係は丁度E-Orig.を種々の濃度でL細胞に接種した場合のウイルス産生高との関係と似て居る。

3. L-Var.接種後E-Orig.の攻撃迄の時間の干渉に及ぼす影響

HA価512/mlのL-Var.をL細胞に接種後、種々の時間後に4 HA価のE-Orig.で攻撃し、干渉が成立するに要する時間を検討した。L-Var.を接種後1時間でE-Orig.

を攻撃した場合に得られる干渉の強さを100%として、任意の時間後に攻撃した場合の干渉の程度を計算すると、同時に与えた場合には50%の干渉が起り、1時間で干渉は極値に達する。其の後此の状態は少くとも100時間迄は持続する。逆にE-Orig.の攻撃をL-Var.を接種する30分前に行つた場合には干渉は全く見られない。此の關係は見方を変えれば、L細胞に対するL-Var.の吸着に要する時間を示して居ると考えられる。事実此れは前報に於て示したE-Orig.のL細胞に対する吸着に要する時間と殆ど同じ値を示して居る。

4. L-Var.をL細胞に感染させた場合の Interferon 産生の有無に就いて

既に Isaacs 一派によつて報告された様に、此の場合にも干渉因子として Interferon 産生の可能性を考えねばならない。此の目的の爲めに超遠心により得られたL-Var. ($10^{8.7}$ EID₅₀)を200mℓの角瓶に培養したL細胞に接種し、12, 24, 72時間後、培養液及び細胞内の Interferon の有無を調べたが、少くとも此處で用いた方法に依つては、其の存在を証拠づける結果は得られなかつた。

5. L-Var.とE-Orig.のL細胞からの遊出態度の相違に就いて

既述の如くL-Var.は低温に於てE-Orig.と同程度にL細胞に吸着し且つE-Orig.を干渉するが、新しくウイルス合成を惹き起す事は出来ない。そこでL-Var.とE-Orig.の吸着状態に差がないかどうかを調べる事とした。即ち 6×10^6 /mℓのL細胞のPBS浮遊液にHA価1024/mℓのL-Var.及びE-Orig.を加え再浮遊させ、36°Cの恒温槽に入れ20分毎にPBSを更新して、両ウイルスのL細胞からの遊出量を調べた。其の結果は両ウイルス共に低温では同程度にL細胞に吸着するが、36°Cの遊出に於ては全く異つた態度を示す事が明らかになつた。即ちE-Orig.に於ては僅かに20%程度しか遊出しないに拘らず、L-Var.に於ては76%以上のウイルスが遊出して来る。即ちL-Var.のL細胞に対する吸着は、丁度Myxovirusのニワトリ赤血球に対する吸着と同じである。

6. L-Var.の酵素活性に就いて

既報の如くL-Var.は4°Cでトリ赤血球に吸着し36°Cで遊出する。又上の実験で示した様にL細胞に対しても同様である。此の事はL-Var.の酵素活性の存在を物語つて居る。そこで佐藤の方法に従つて、マウス肺乳剤に含まれる α -Inhibitorに対する消化能をL-Var.及びE-Orig.に就いて比較した。即ち256/mℓのHAI価を持つてマウス肺乳剤にHAI価2560/mℓのL-Var.及びE-Orig.を加え、36°Cに加温し種々の時間に取り出し、56°Cに加熱して赤血球凝集素を破壊した後、夫々のHAI価の減少を調べた。其の結果は兩者共に同様のInhibitor消化能が証明された。

7. 抗血清の干渉現象に及ぼす影響に就いて

L-Var.のL細胞に対する吸着はE-Orig.とは異り、36°Cで容易に遊出して来る血球型のそれである事が判つたが、此の様な結合に対して抗血清が如何なる影響を示すかは非常に興味がある。そこで此處ではL-Var.のL細胞に対する吸着を干渉現象によつて間接的に調べ、其の干渉現象に及ぼす抗血清の影響に就いて調べた。L細胞に種々の濃度のL-Var.を接種後、5, 10, 20, 30及び60分後に夫々Hanks液で洗滌し、抗血清を36°C30分処理後それを洗い去りE-Orig.を攻撃する。対照としては抗血清の代りに正常血清を使用した。

96時間後に培養液中のHA価を測定し、抗血清による干渉の減少の割合を調べた。其の結果L-Var.に依る干渉は、抗血清を60分後に加えても容易に消失する事が判つた。換言すれば、L-Var.の吸着は60分後に於ても猶抗血清の作用を受け得る状態にある。

8. L-Var. ウイルス粒子の密度分布に就いて

今迄の実験で度々経験した如く、E-Orig. は20,000 \times 30分の遠心で99%が沈降するが、L-Var. では僅かに50%しか沈降せず、猶50%のHA価が上清に残つて居る。又E-Orig. をL細胞に感染せしめた場合には感染粒子の出現前に非感染性のHAが出現するが、これを密度勾配遠心法によつて感染粒子から分離する目的で此の実験を行つた。前述の方法で蔗糖密度勾配遠心を行つた所、E-Orig. に関してはHA活性は非常に狭い範囲に集中して居るのに反し、L-Var. のそれは非常に広い領域に亘つて居る。特に密度の低い方に可成りのHA活性が見られるのが特徴的である。又各分劃に就いてEID₅₀を測定するに密度の低い分劃には、非常に感染価の低いHAが存在する事が判つた。此の密度の低い感染価の低いHA活性を示す部分が、此の系の特徴であるHAの過剰生産と関係があるものと思われる。

考 察 及 び 総 括

此の実験の目的は、E-Orig. を一代L細胞を通過せしめる事によつて出来たL-Var. が卵に対する感染力を持つて居るに拘らず、再びL細胞に感染する事が出来ない理由を解明する事にあつた。其処で先づL細胞に対するL-Var. の吸着を見る実験が行われたが、4°C反応で見る限りに於ては、全くE-Orig. との間に差異は見られず、又 α -inhibitor に対する酵素活性を調べても相違を見出し得なかつた。此の事はウイルスの表面性状が、恰もE-Orig. のそれと同様に無傷に保存されて居り、もつと内部の核酸部分の欠損的变化が、L細胞に対する感染性の消失に大きな役割を演じてる様に思われるかも知れない。此の可能性は否定された訳ではないが、此の実験からは此の問題に対する解答を得る事は出来ない。然し乍ら先に石田及びAckermann等はインフルエンザウイルスの卵漿尿膜に対する実験に於て吸着に関する興味ある事実を指摘した。即ち吸着には4°Cで起る時期と、引き続く36°Cで起る時期との二段階のある事を述べて居る。前者は抗血清の作用を受けて容易に吸着が解消される状態であり、後者はウイルスと細胞が不可逆的な結合を形成する時期で、此の時期は既に抗血清の作用を受けない状態にある。所が此の実験に於て観察された様に、L-Var. のL細胞に対する結合は、36°Cに於ても容易に抗血清の遠響を受ける事が示された。此の事実こそ本系に於ける最大の特色であり、此のウイルスのL細胞感染力の消失を説明する一つの鍵である。此の不可逆的な結合の阻害が、L-Var. が細胞内侵入の次の段階へと発展す可き過程に障害を与えるものと考えられる。又L-Var. はE-Orig. のもつ溶血能を消失して居るが、此の溶血能は、卵を通過して得られたウイルスのみが持つものであり、HeLa, FL, L, 人胎児腎、同じく肺及び猿腎細胞等の組織培養細胞を通過する事に依り容易に消失せしめる事が出来る。又此の溶血能は正常の漿尿膜に対する免疫血清によつて抑制される事から、卵の成分に由来する外来性の因子と考えられる。従つて此の溶血能の消失と感染力との消失は独立した事象と思われる。L-Var. のE-Orig. に対する干渉現象は、L-Var. がL細胞感染に際して何等の抗原産生を行わない事、及び干渉の成立が比較的短時間に成立する事、Interferon が介在しない事等から、先にBaludaが紫外線で不活化したNDVで示したと同様に、細胞表面のReceptor に対する作用と考えて置き度い。

審 査 結 果 要 旨

マウスに由来する線維芽細胞LでSendai Virusを増殖させると、1)他のインフルエンザウイルスと異つて卵に感染性を持つ粒子が産生される事、2)しかもそこで産生されたウイルス(以後L-Var.と略記)は親ウイルス(E-Orig.と略記)の持つて居た溶血能とL細胞に対する感染性と言う二つの遺伝学的な目じるしを失つて居り、宿主依存性変異の中でも珍しいUnadaptive Variationを動物ウイルスで始めて見出した所に意義がある。主論文では特に此のL-Var.が何故L細胞に感染性を持たないかと言う説明を求めて解析を試みた。先づ吸着の過程を調べた所、吸着段階には4°Cで起る可逆的な結合と36°Cで起る不可逆的な結合の二つがあり前者は抗血清に依り其の結合状態は解かれるが、後者は抗血清の影響を受けない。L-Var.の可逆的結合はE-Orig.と同程度に起るが温度を上げると76%以上が遊出して来るし、又此の結合状態は抗血清に依り容易に取り除かれる。此の事実からL-Var.はL細胞に対しては可逆的な結合しか造り得ず、不可逆的な結合過程迄進み得ず、其の為にウイルス合成に至らないものと考えられた。そこでもう一つの消失した遺伝的な目じるし即ち溶血能との関係を調べて見るとSendai ウイルスの溶血能は卵を通過したウイルスのみが持つて居り、此れは種々の組織培養細胞例えば人胎児肺の組織培養細胞を通過する事に依り失わせる事が可能であつた。にも拘らず此処で出来たウイルスはL細胞に対する感染性は持つて居るし、E-Orig.のメタノール精製で此の溶血能を取除く事も出来るので外来性の因子と結論され、従つてL細胞に対する感染力と言う目じるしとは明らかに分離可能であつた。L-Var.の表面の構造を調べると、先づ α -インヒビターに対する酵素活性はE-Orig.と変らない。次に超遠心で調べるとL-Var.はE-Orig.に比し沈降恒数が低く、又密度分布も低い方に拡がつて居る。結論として、L細胞に対して不可逆的吸着を起し得ない変異株がL細胞で合成され、其の様な粒子は密度も低く沈降恒数も低い事が示された。